

[文章编号] 1007-3949(2005)13-05-0557-03

• 实验研究 •

## 罗格列酮对胰岛素抵抗大鼠血一氧化氮和内皮素的影响

凌宏艳<sup>1,2</sup>, 胡必利<sup>2</sup>, 奉水东<sup>3</sup>, 周寿红<sup>2</sup>, 何剑琴<sup>2</sup>, 杨丝丝<sup>2</sup>, 胡弼<sup>2</sup>

(1. 中南大学药理学教研室, 湖南省长沙市 410078; 南华大学 2. 生理学教研室, 3. 流行病学教研室, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 药理学; 胰岛素抵抗; 放射免疫法; 一氧化氮; 内皮素 1; 血管内皮功能; 罗格列酮

[摘要] 目的 探讨罗格列酮对胰岛素抵抗大鼠血一氧化氮和内皮素的影响及其可能作用机制。方法 采用高果糖饲料诱导 SD 大鼠建立胰岛素抵抗模型, 并以普通饲料喂养作为对照组, 4 周后分别用与不用罗格列酮处理对照组和模型组。8 周末测定各组收缩压、空腹血糖、血胰岛素、血脂、血清一氧化氮和血浆内皮素的含量及主动脉一氧化氮合酶活性。结果 模型组收缩压、血胰岛素和血浆内皮素均高于对照组; 主动脉一氧化氮合酶活性和一氧化氮含量显著低于对照组, 同时出现脂质代谢紊乱。罗格列酮能显著降低模型组收缩压、血胰岛素和血浆内皮素; 提高主动脉一氧化氮合酶活性和一氧化氮含量; 改善胰岛素抵抗及脂质代谢紊乱, 但罗格列酮不影响对照组大鼠上述各项指标。结论 罗格列酮能改善胰岛素抵抗大鼠血管内皮功能, 其机制可能是: 一方面通过降低血压、提高胰岛素的敏感性、改善脂质代谢紊乱; 另一方面通过提高主动脉一氧化氮合酶活性促进主动脉一氧化氮释放, 同时抑制内皮素的增加。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

### Effects of Rosiglitazone on the Levels of Nitric Oxide and Endothelin in Rats with Insulin Resistance

LING Hong-Yan<sup>1,2</sup>, HU Bi-Li<sup>2</sup>, FENG Shui-Dong<sup>3</sup>, ZHOU Shou-Hong<sup>2</sup>, HE Jian-Qin<sup>2</sup>, YANG Si-Si<sup>2</sup>, and HU Bi<sup>2</sup>

(1. Department of Pharmacology, Central South University, Changsha 410078; 2. Department of Physiology, 3. Department of Epidemiology, Nanhua University, Hengyang 421001; China)

[KEY WORDS] Nitric Oxide; Endothelin 1; Vascular Endothelial Function; Rosiglitazone; Insulin Resistance; Nitric Oxide Synthase

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of rosiglitazone on the blood levels of nitric oxide (NO) and endothelin 1 (ET-1) in insulin resistant rats and the underlying mechanism. **Methods** Male Sprague-Dawley (SD) rats were fed with high fructose to induce insulin resistant rats model, rats were treated with or without rosiglitazone after 4 weeks. At the end of 8th week, systolic blood pressure (SBP), fasting blood sugar (FBS), fasting serum insulin (FSI), blood lipids, NO, ET-1 and aortic nitric oxide synthase (NOS) activity were measured respectively in groups. **Results** Compared with control group, SBP, FSI and ET-1 in model group significantly increased; aortic NOS activity and NO levels were significantly lowered. At the same time, the abnormality of lipid metabolism appeared in the model group. After rosiglitazone treatment, SBP, FSI and ET-1 remarkably reduced; aortic NOS activity and NO levels significantly increased; insulin resistance and the abnormality of lipid metabolism were improved. While all indexes did not change significantly after rosiglitazone treated control rats. **Conclusions** Rosiglitazone may improve vascular endothelial function in rats with insulin resistance by decreasing blood pressure, increasing insulin sensitivity, improving the abnormality of lipid metabolism, besides, it could be associated with nitric oxide elevating by increasing nitric oxide synthase activity and inhibiting endothelin increasing.

胰岛素抵抗在 2 型糖尿病的发病过程中起重要作用, 血管内皮功能异常是糖尿病血管并发症的重要机制。一氧化氮(nitric oxide, NO) 和内皮素是血管内皮细胞分泌的一对相互拮抗的血管活性物质, 参与内皮功能的调节, 一旦两者失衡可导致血管舒缩功能失调、血小板凝聚和内皮细胞增殖, 最终导致动脉粥样硬化的发生。罗格列酮属于噻唑烷二酮类

药物, 是一种新型的胰岛素增敏剂, 能增加 2 型糖尿病和肥胖患者以及某些胰岛素抵抗动物模型外周组织对胰岛素的敏感性, 从而改善胰岛素抵抗。近来发现, 罗格列酮对某些高血压动物模型和原发性高血压患者有降压作用, 且还能改善内皮依赖性血管舒缩功能障碍, 降低血管紧张度<sup>[1-5]</sup>。罗格列酮还能增加体外培养的内皮细胞血管扩张物质如 NO 和 C 型钠尿肽<sup>[6,7]</sup>的释放; 同时也能抑制 DOCA-salt 大鼠内皮素的释放<sup>[4]</sup>。有关罗格列酮对胰岛素抵抗大鼠血 NO 和内皮素的影响如何, 目前还没有这方面的报道。为此, 本研究采用高果糖饲养 SD 大鼠建立

[收稿日期] 2004-11-12 [修回日期] 2005-07-05

[基金项目] 湖南省自然科学基金(01JJY2147)资助

[作者简介] 凌宏艳, 博士研究生, 讲师, 研究方向为心血管药理, E-mail 为 linghongyan0203@126.com。通讯作者胡弼, 教授, 主要研究方向为心血管生理, E-mail 为 Hu50Bi@hotmail.com。

胰岛素抵抗模型,观察罗格列酮对胰岛素抵抗大鼠血 NO 和内皮素的影响并分析可能的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器和试剂

HX-1 型小动物血压仪(中南大学湘雅医学院生理学教研室)、HITACH 717 全自动生化分析仪(日本日立),全自动放射免疫  $\gamma$  计数仪和 722 分光光度计(上海第二仪器厂)。NO 和一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS) 检测试剂盒购于南京建成生物研究所;胰岛素检测试剂盒购于中国原子能科学研究院;内皮素检测试剂盒购于北京北免东亚生物技术研究所。罗格列酮购于浙江万马药业有限公司;D-果糖购于上海生物工程有限公司。

### 1.2 胰岛素抵抗大鼠模型的建立及实验分组

清洁级雄性 SD 大鼠 48 只,体重  $200 \pm 20$  g,由本校实验动物学部提供。分笼适应性喂养 1 周,随机分成四组:对照组( $n = 12$ )普通饲料喂养 8 周;模型组( $n = 12$ )高果糖饲料<sup>[8]</sup>喂养 8 周;罗格列酮+对照组( $n = 12$ )普通饲料喂养 8 周,后 4 周同时用罗格列酮[5 mg/(kg·d)溶于饮水中]处理;罗格列酮+模型组( $n = 12$ )高果糖饲料喂养 8 周,后 4 周同时用罗格列酮处理。8 周末所有动物空腹过夜,用尾套法测量大鼠的收缩压后麻醉处死,心脏放血制备血清和血浆,进行下列指标的测定。

### 1.3 指标检测

1.3.1 胰岛素敏感指数测定 采用 HITACH 717 全自动生化分析仪测定空腹血糖(fasting blood sugar, FBS),放射免疫法测定空腹血清胰岛素(fasting serum insulin, FSI),按照李氏法<sup>[9]</sup>计算胰岛素敏感指数(insulin sensitive index, ISI)。

1.3.2 血脂、一氧化氮和内皮素的测定 采用酶法测定甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC);血浆内皮素采用放射免疫法测定;NO 采用硝酸还原酶法,于 550 nm, 0.5 cm 光径,测定各管的吸光度值,按照公式计算 NO 含量。

1.3.3 主动脉一氧化氮合酶活性测定 放血后迅速取出胸主动脉, PBS 漂洗,除去血液,一半存入 EP 管,放入液氮保存。另一半滤纸吸干,称重,按重量体积比 1:9 加入 0.86% 的生理盐水制备 10% 的组织匀浆,3 000 rpm 离心 10 min,取上清液 50  $\mu$ l 以

考马斯亮兰定量蛋白,于 530 nm, 1 cm 光径处测定各管的吸光度值,计算总 NOS(tNOS)、诱导型 NOS(iNOS) 含量,两者之差为固有型 NOS(cNOS) 含量。

### 1.4 统计学处理

数据均采用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间差异采用单因素方差分析,有显著差异者用  $q$  检验进行比较, $P < 0.05$  为差异显著性。

## 2 结果

### 2.1 罗格列酮对大鼠内皮素和一氧化氮的影响

与对照组相比,模型组内皮素显著升高,NO 显著降低,罗格列酮处理后的模型组内皮素显著降低,NO 显著升高;罗格列酮对对照组上述指标无显著影响(表 1, Table 1)。

表 1. 罗格列酮对内皮素和一氧化氮的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 12$ )

Table 1. Effects of rosiglitazone on endothelin and NO levels

| 分 组       | 内皮素 (ng/L)                    | 一氧化氮 ( $\mu$ mol/L)           |
|-----------|-------------------------------|-------------------------------|
| 对照组       | 50.44 $\pm$ 4.21              | 40.67 $\pm$ 3.69              |
| 罗格列酮+ 对照组 | 52.61 $\pm$ 3.98              | 41.09 $\pm$ 3.17              |
| 模型组       | 73.87 $\pm$ 7.20 <sup>b</sup> | 36.25 $\pm$ 2.41 <sup>a</sup> |
| 罗格列酮+ 模型组 | 62.98 $\pm$ 6.92 <sup>d</sup> | 39.01 $\pm$ 3.02 <sup>c</sup> |

a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$ , 与对照组比较; c:  $P < 0.05$ , d:  $P < 0.01$ , 与模型组比较。

### 2.2 罗格列酮对大鼠收缩压、血糖和血脂的影响

与对照组相比,模型组收缩压、FSI、TG、TC、LDLC 显著升高,ISI、HDLC 显著降低,FBS 有升高,但无显著性差异;罗格列酮处理后的模型组收缩压、FSI、TG 显著降低,ISI、HDLC、TC 显著升高;罗格列酮对对照组上述指标无显著影响(表 2, Table 2)。

表 2. 罗格列酮对收缩压、血糖和血脂的影响

Table 2. Effects of rosiglitazone on SBP, blood sugar and blood lipids ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 12$ )

| 项 目           | 对照组               | 罗格列酮+<br>对照组      | 模型组                            | 罗格列酮+<br>模型组                   |
|---------------|-------------------|-------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 收缩压(mm Hg)    | 120.24 $\pm$ 4.38 | 120.59 $\pm$ 2.96 | 156.30 $\pm$ 5.02 <sup>b</sup> | 125.20 $\pm$ 4.81 <sup>d</sup> |
| FBS (mmol/L)  | 5.36 $\pm$ 0.55   | 5.39 $\pm$ 0.64   | 5.62 $\pm$ 0.43                | 5.41 $\pm$ 0.42                |
| FSI (Mlu/L)   | 17.62 $\pm$ 3.50  | 17.01 $\pm$ 3.93  | 34.82 $\pm$ 4.92 <sup>b</sup>  | 19.51 $\pm$ 4.46 <sup>d</sup>  |
| ISI           | -4.55 $\pm$ 0.38  | -4.52 $\pm$ 0.31  | -5.28 $\pm$ 0.36 <sup>b</sup>  | -4.66 $\pm$ 0.29 <sup>d</sup>  |
| TG (mmol/L)   | 0.82 $\pm$ 0.13   | 0.83 $\pm$ 0.10   | 1.38 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>   | 0.91 $\pm$ 0.11 <sup>d</sup>   |
| TC (mmol/L)   | 1.40 $\pm$ 0.06   | 1.39 $\pm$ 0.11   | 1.45 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>   | 1.51 $\pm$ 0.09 <sup>c</sup>   |
| HDLC (mmol/L) | 0.79 $\pm$ 0.03   | 0.81 $\pm$ 0.05   | 0.49 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>   | 0.70 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>   |
| LDLC (mmol/L) | 0.12 $\pm$ 0.03   | 0.13 $\pm$ 0.06   | 0.38 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>   | 0.45 $\pm$ 0.12                |

a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$ , 与对照组比较; c:  $P < 0.05$ , d:  $P < 0.01$ , 与模型组比较。

### 2.3 罗格列酮对主动脉一氧化氮合酶活性的影响

模型组 NOS 活性显著低于对照组, 主要是 cNOS 活性降低, iNOS 无明显变化。罗格列酮处理后的模型组 NOS 活性显著升高, 主要是 cNOS 活性升高, iNOS 无明显变化(表 3, Table 3)。

表 3. 罗格列酮对主动脉一氧化氮合酶活性的影响

Table 3. Effects of Rosiglitazone on aortic NOS activity in each group ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ , U/mg)

| 指标   | 对照组         | 罗格列酮+<br>对照组 | 模型组                      | 罗格列酮+<br>模型组             |
|------|-------------|--------------|--------------------------|--------------------------|
| tNOS | 5.36 ± 0.77 | 5.17 ± 0.78  | 4.38 ± 0.78 <sup>a</sup> | 5.14 ± 0.60 <sup>b</sup> |
| iNOS | 2.92 ± 0.71 | 2.93 ± 0.71  | 2.90 ± 0.54              | 2.93 ± 0.45              |
| cNOS | 2.25 ± 0.63 | 2.24 ± 0.74  | 1.49 ± 0.52 <sup>a</sup> | 2.18 ± 0.57 <sup>b</sup> |

a:  $P < 0.05$ , 与对照组比较; b:  $P < 0.05$ , 与模型组比较。

## 3 讨论

本实验通过高果糖饲养 SD 大鼠成功地复制了胰岛素抵抗高血压大鼠模型, 该模型表现高血压、高胰岛素血症和脂质代谢紊乱, 同时血内皮素增加和 NO 降低。研究表明<sup>[10, 11]</sup>, 高血压、高胰岛素血症和脂质代谢紊乱是导致血管内皮受损的主要因素, 本实验结果发现罗格列酮能降低模型组大鼠血压、改善胰岛素抵抗和纠正脂质代谢紊乱, 说明罗格列酮能改善血管内皮功能。

血管内皮细胞通过释放 NO 松弛血管平滑肌和抑制内皮细胞增殖, 同时释放内皮素收缩血管和促进内皮细胞增殖。一旦两者失衡可导致血管舒缩功能失调、单核细胞对血管内皮的粘附性增强<sup>[12]</sup>、血小板凝聚和内皮细胞增殖, 是引起一系列疾病的基础。本实验观察到模型组主动脉 tNOS 活性降低(主要是 cNOS 降低, iNOS 无明显变化), 血清 NO 产生减少。cNOS 主要存在于内皮细胞中, 具有  $Ca^{2+}$  依赖性, 是促进 NO 产生的主要物质; iNOS 主要存在于血管平滑肌中, 为非  $Ca^{2+}$  依赖性, 表明模型组血管内皮细胞 NO 释放减少可能是主动脉 cNOS 活性降低所致, 这与 Miatello 等<sup>[13]</sup>报道的结果相一致。用罗格列酮处理后, 主动脉 NOS 活性升高、血清 NO 产生增加, 提示罗格列酮可能通过提高主动脉 NOS 活性、促进 NO 释放, 从而保护血管内皮功能。

血浆内皮素水平增加是内皮功能受损的另一个标志, 并且加重血管损伤。本实验发现, 模型组血浆内皮素水平显著高于对照组, 罗格列酮能降低模型

组血浆内皮素水平。一方面可能促进内皮细胞 NO 的合成和释放, 从而使机体保持较低的内皮素水平; 另一方面通过降低高胰岛素血症、纠正血脂紊乱、恢复胰岛素的敏感性等作用阻断二酰甘油蛋白激酶 C 系统和促丝裂原活化激酶系统的作用, 降低内皮素的合成和释放<sup>[14]</sup>。

总之, 以上结果表明罗格列酮对胰岛素大鼠内皮功能具有保护作用, 其可能作用机制是一方面通过降低血压、提高胰岛素的敏感性、改善脂质代谢紊乱; 另一方面通过提高主动脉 NOS 活性促进主动脉 NO 释放, 同时抑制内皮素增加。因而罗格列酮的应用为心血管系统疾病尤其是胰岛素抵抗所并发的血管系统疾病的预防和治疗提供新的思路和方向。

### [参考文献]

- [1] Walker AB, Chattington PD, Buckingham RE, Williams G. The thiazolidinedione rosiglitazone (BRL-49653) lowers blood pressure and protects against impairment of endothelial function in Zucker fatty rats. *Diabetes*, 1999, **48**: 1448-453
- [2] Diep QN, Mabrouk ME1, Cohn JS, Endemann D, Amiri F, Virdis A, et al. Structure, endothelial function, cell growth, and inflammation in blood vessels of angiotensin II-infused rats: Role of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ . *Circulation*, 2002, **105**: 2296-302
- [3] Raji A, Seely EW, Bekins SA, Williams GH, Simonson DC. Rosiglitazone improves insulin sensitivity and lowers blood pressure in hypertensive patients. *Diabetes Care*, 2003, **26** (1): 172-178
- [4] Iglarz M, Touyz RM, Amiri F, Lavoie MF, Diep QN, Schiffrin EL. Effect of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  and activators on vascular remodeling in endothelin dependent hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, **23**: 45-51
- [5] 王敏哲, 马琳, 李旭芳. 罗格列酮改善 2 型糖尿病患者血管内皮功能的临床观察. *现代医学*, 2004, **32** (3): 190-192
- [6] Calnek DS, Mazzella L, Roser S, Roman J, Hart CM. Peroxisome proliferator-activated receptor ligands increase release of nitric oxide from endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, **23**: 52-57
- [7] Fukunaga Y, Itoh H, Doi K, Tanaka T, Yamashita J, Chun TH, et al. Thiazolidinediones, peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists, regulate endothelial cell growth and secretion of vasoactive peptides. *Atherosclerosis*, 2001, **158** (1): 113-119
- [8] Reaven GM, Hwang IS, Ho H. Fructose induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension*, 1987, **10**: 512
- [9] 李光伟, 潘孝仁. 检测人群胰岛素敏感性一项新指标. *中华内分泌代谢杂志*, 1998, **37**: 390-392
- [10] Shinozaki K, Kashiwagi A, Masada M, Okamura T. Stress and vascular responses: oxidative stress and endothelial dysfunction in the insulin-resistant state. *J Pharmacol Sci*, 2003, **91** (3): 187-191
- [11] 李绍冰, 宋光耀, 王明维, 王智华, 马博青. 罗格列酮对老年高血压合并高胰岛素血症患者血管内皮功能的影响. *中国老年学杂志*, 2004, **24** (3): 230-231
- [12] 李伟, 吴智勇. 高血压病并胰岛素抵抗患者单核细胞粘附功能的变化. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (2): 162-164
- [13] Miatello R, Risler N, Castro C, Gonzalez S, Ruttler M, Cruzado M. Aortic smooth muscle cell proliferation and endothelial nitric oxide synthase activity in fructose-fed rats. *Am J Hypertens*, 2001, **14** (11): 1135-1141
- [14] Schiffrin EL. Endothelin: role in experimental hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2000, **35** (Suppl 2): S33-35

(此文编辑 文玉珊)